

AP

7/3,AB,LA/4
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

Proline-rich antibacterial peptide(s) from *Podisus maculiventris* - esp.
useful to protect plants against pathogenic bacteria, also for
antibacterial therapy of animals

Patent Assignee: RHONE POULENC AGROCHIMIE (RHON)

Inventor: BULET P; HETRU C; HOFFMAN J; TCHERNYCH S

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No | Kind | Date | Applicat No | Kind | Date | Week |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| FR 2732345 | A1 | 19961004 | FR 954130 | A | 19950403 | 199646 B |

Priority Applications (No Type Date): FR 954130 A 19950403

Patent Details:

| Patent No | Kind | Lan | Pg | Main IPC | Filing Notes |
|------------|------|-----|-------------|----------|--------------|
| FR 2732345 | A1 | 16 | C07K-007/08 | | |

Abstract (Basic): FR 2732345 A

Peptides of formula (I) are new: VDKPDYRPRP-X (I) X = a peptide
residue comprising at least one tripeptide motif PRP.

USE - The proline-rich peptides of formula (I) have antibacterial
activity against gram negative bacteria. They are useful for protecting
plants against pathogenic bacteria (claimed), but could also be used
for antibacterial therapy of animals, including humans.

Dwg.0/0

Language, Pages: FR 2732345 (16)

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 732 345 ^{AP}

②1 N° d'enregistrement national : 95 04130

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 K 7/08, 1/14, A 01 N 63/02//A 61 K 38/10

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 03.04.95.

③0 Priorité :

⑦1 Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —
FR.

⑦2 Inventeur(s) : BULET PHILIPPE, HOFFMAN JULES,
HETRU CHARLES et TCHERNYCH SERGUEY.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 04.10.96 Bulletin 96/40.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire :

⑤4 PEPTIDE ANTIBACTERIEN.

⑤7 1. Peptide antibactérien.

2. Il est de formule:

VDKPDYRPRP-X

dans laquelle X est un reste peptidique variable compre-
nant au moins un chaînon "PRP"

3. Il est utilisable comme antibactérien.

FR 2 732 345 - A1



Peptide antibactérien

5 La présente invention a pour objet de nouveaux peptides riches en protéines ayant des propriétés antibactériennes, des compositions utilisables en agriculture et en thérapie humaine ou animale contenant ce peptide comme matière active. L'invention concerne également un procédé de préparation de ce peptide.

10 On sait de longue date que les insectes présentent une résistance efficace contre les bactéries. Cette défense est pour une large part basée sur la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides. Cette défense est due à la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides à large spectre d'activité. Cette synthèse est induite par une blessure septique ou par l'injection d'une faible dose de bactéries.

15 De plus il est connu que les insectes ont développé une résistance importante vis à vis des champignons.

Il a maintenant été isolé, à partir d'une induction chez l'hémiptère *Podisus maculiventris*, des peptides riches en prolines, qui présentent des caractéristiques remarquables ainsi que des propriétés antibactériennes.

20 Plus particulièrement un premier aspect de l'invention concerne les peptides de formule I:

VDKPDYRPRP-X

dans laquelle X est un reste peptidique variable comprenant au moins un chaînon "PRP".

De préférence X peut être choisi dans le groupe comprenant:

25 X1= WPRPPSM

X2= GPRPII

X3= GPRPIR

X4= GPRPIIVM

30 Dans la suite, les molécules de formule I avec respectivement X = X1, X2, X3 et X4, seront appelées respectivement métaalnikowine 1 (Mét 1), métaalnikowine 2 (Mét 2), métaalnikowine 3 (Mét 3) et métaalnikowine 4 (Mét 4).

Ces molécules, de taille réduite, comportent de 16 à 18 résidus riches en proline (P) (de 5 à 6 prolines) et comportent 4 à 5 résidus basiques. Elle sont appelées dans la suite "métaalnikowines".

35 Un autre aspect de l'invention concerne un procédé pour l'obtention et l'isolement des peptides ci-dessus, qui est caractérisé en ce que successivement:

a) on fait agir sur des *Podisus maculiventris* au moins un inducteur bactérien de la synthèse biologique de la molécule;

b) on effectue l'extraction par mise en contact d'un broyat de *Podisus maculiventris* obtenues précédemment avec un milieu acide sous agitation, puis par centrifugation;

c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés sur colonne séparatrice

d) on purifie les extraits.

e) on caractérise le peptide.

La première étape (induction bactérienne), est réalisée par simple agression physique telle qu'une blessure par exemple une piqûre, ou bien, et de préférence, à partir de hémolymphe de punaises *Podisus maculiventris* adultes en les anesthésiant à l'aide d'un gaz anesthésiant, par exemple du gaz carbonique ou tout gaz ayant des effets similaires, et en les immunisant par piqûre thoracique à l'aide d'une aiguille de préférence plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne. De préférence, l'inoculation est effectuée avec au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram positif) et les bactéries (Gram négatif). Comme exemple représentatif préféré de bactérie (Gram positif), on peut citer *Micrococcus luteus*. Comme exemple représentatif préféré de bactérie (Gram négatif), on peut citer *Escherichia coli*. De manière plus préférée on peut utiliser simultanément au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram positif) et au moins une bactérie choisie dans le groupe comprenant les bactéries (Gram négatif).

De manière préférée la seconde étape (extraction) on met en contact le broyat de *Podisus maculiventris* ou l'hémolymphe de *Podisus maculiventris* avec un milieu acide, constitué d'une solution acide d'un acide, ou neutre (de pH de 2 à 7). La solution peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple d'acide trifluoroacétique. L'addition habituelle d'un inhibiteur de protéase n'est ici pas nécessaire en raison de la résistance naturelle remarquable du peptide métaalnikowine vis à vis des protéases. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à froid à une vitesse de 5000 à 20000 tpm, pendant 15 à 60 mn.

De manière préférée la troisième étape (fractionnement), le lavage des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.

De manière préférée la quatrième étape (purification) est effectuée avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente.

De manière préférée, dans la dernière étape (caractérisation), la nature du peptide est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d' Edman (Acta Chemica Scandinavia 10 (1956) p; 761-768). Selon cette méthode on obtient les structures suivantes:

VDKPDYRPRPWPRPPSM

VDKPDYRPRPGPRPII

VDKPDYRPRPGPRPIR

VDKPDYRPRPGPRPIIVM

Les masses mesurées des métalnikowines ci-dessus sont respectivement de:
 $2094 \pm 0,3$ Da; $1876,11 \pm 0,3$ Da; $1919 \pm 0,5$ Da; $2234 \pm 0,3$ Da;

Or les masses calculées sur la base des données de séquence sont respectivement de:
 $2094,3$ Da; $1876,17$ Da; $1919,2$ Da; $2234,5$ Da.

Ces bonnes corrélations confirment les séquences proposées.

Ces molécules ont des propriétés antibactériennes vis- à vis de germes à Gram négatif.

Selon un autre aspect l'invention a pour objet une composition antibactérien utilisable pour la protection des plantes contre les maladies bactériennes.

Les exemples suivants illustrent l'obtention et les propriétés antibactériennes des peptides et des compositions selon l'invention.

Exemple 1: Isolement et caractérisation du peptide

on procède selon les étapes suivantes:

- induction naturelle de la synthèse biologique :

Des *Podisus maculiventris* sont immunisées par piqure au niveau thoracique à proximité de l'insertion alaire à l'aide d'une fine aiguille plongée avant chaque inoculation dans une suspension bactérienne d'*Escherischia coli* 1106 (Gram négatif) tué à la chaleur pendant 2 mn à 100°C . Les insectes sont conservés à 20°C durant 24 heures.

- extraction et de purification :

L'hémolymphe (1,2ml) est prélevée par incision de la cuticule. Elle est transférée dans un tube maintenu au froid en présence d'un inhibiteur de protéases (aprotinine) puis

centrifugée à 2000 G(10.000 tpm) pendant 25 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est immédiatement soumis aux différentes étapes de la purification.

Fractionnement de l'extrait sur cartouches Sep-Pak C18

Après dépôt de l'extrait sur des cartouches Sep-Pak C18, les molécules à caractère hydrophile sont éliminées par un simple lavage par 5 ml d'eau acidifiée à l'acide trifluoacétique (TFA) à 0,05%.

L'élution des molécules hydrophobes est réalisée avec des solutions à 20, 50 et 80% d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%, 5 ml par cartouche).

Les fractions recueillies sont dénommées "Elution 20%", "Elution 50%" et "Elution 80%" et concentrées sous vide. Les fractions sont ensuite reconstituées avec de l'eau qualité HPLC avant l'analyse en HPLC.

Purification par HPLC des molécules à activité antibactérienne

première étape:

Les fractions "Elution 20%" et "Elution 50%" sont analysées séparément sur deux colonnes de tamisage moléculaire montées en série (SEC 2000 + SEC 3000, Beckman) sous 30% d'acétonitrile en présence de TFA 0,05% à un débit de 0,5 ml/mn.

Les fractions ayant une activité antibactérienne sont ensuite purifiées en chromatographie de phase inverse en HPLC.

Purification finale: deux étapes sont nécessaires pour la purification des molécules antibactériennes.

- a) Les fractions présentant cette activité ont été dans un premier temps purifiées sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 52% dans l'eau acidifiée (TFA à 0,05%) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,44% d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min.

- b) les fractions actives résultantes de a) sont ensuite purifiées sur une colonne Aquapore OD 300 C18.

L'élution est réalisée dans un gradient linéaire biphasique d'acétonitrile de 2 à 17% dans l'eau acidifiée (TFA 0,05%) en 10 minutes et de 17 à 27% en 45 min à un débit de 1 ml/min. La métalnikowine 1 est obtenue pour un pourcentage de 19,4% d'acétonitrile, la métalnikowine 2 à un pourcentage de 20,7% d'acétonitrile, la métalnikowine 3 à un pourcentage de 20,7% d'acétonitrile et la métalnikowine 4 à un pourcentage de 19,7% d'acétonitrile.

La pureté de la fraction active est contrôlée par électrophorèse capillaire avant la détermination de la séquence par dégradation d'Edman et analyse en spectrométrie de masse.

Exemple 2: Test in vitro: Mesure de l'activité antibactérienne par microspectrophotométrie

Pur chaque souche de bactérie utilisée (E.coli ; Mluteus) une colonne isolée est mise en suspension dans 10 ml de milieu PB (Poor Broth, milieu Luria Bertani dépourvu d'extrait de levure) DIFCO et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation lente.

Les bactéries à tester sont ramenées à une densité optique à 600 nm de 0,001 dans un milieu de culture frais. On dépose 10µl de chaque fraction dans des plaques de microtitration en présence de 100 µl de la suspension bactérienne. Au bout de 24 heures d'incubation à 25°C, on évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.

Dans ces conditions on observe une inhibition à 50% aux concentrations, exprimées en µM, indiquées dans le tableau suivant:

| | Métalnikowine | | | |
|-------------|---------------|-------|-------|-------|
| Bactérie | Mét 1 | Mét 2 | Mét 3 | Mét 4 |
| E.Coli 1106 | 10 | 12 | 14 | 21 |
| E.Coli D31 | 18 | 11 | 15 | 9 |
| E.Coli D22 | 21 | 13 | 12 | 31 |

Ces résultats montrent l'excellente activité antibactérienne du peptide selon l'invention, qui peut s'appliquer aux domaines humain, animal et végétal.

Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antibactérien à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer à titre d'exemples le riz, les céréales, notamment le blé et l'orge, ainsi que les plantes arboricoles, fruitières, légumières.

La présente invention a également pour objet des compositions, utilisables comme agents antibactériens, contenant comme matière(s) active(s) un (ou plusieurs) composé selon l'invention tel que décrit précédemment, en mélange avec les supports solides ou liquides, acceptables en agriculture et les agents tensio-actifs également acceptables en agriculture. En particulier sont utilisables les supports inertes et usuels et les agents tensio-actifs usuels. Ces compositions recouvrent non seulement les compositions prêtes à être appliquées sur la culture à traiter au moyen d'un dispositif adapté, tel qu'un dispositif de

pulvérisation, mais également les compositions concentrées commerciales qui doivent être diluées avant application sur la culture.

Ces compositions peuvent contenir aussi toute sorte d'autres ingrédients tels que, par exemple, des colloïdes protecteurs, des adhésifs, des épaississants, des agents thixotropes, des agents de pénétration, des stabilisants, des séquestrants, etc... Plus généralement les composés utilisés dans l'invention peuvent être combinés à tous les additifs solides ou liquides correspondant aux techniques habituelles de la mise en formulation.

D'une façon générale, les compositions selon l'invention contiennent habituellement de 0,05 à 95 % environ (en poids) d'un composé selon l'invention (appelé par la suite matière active), un ou plusieurs supports solides ou liquides et, éventuellement, un ou plusieurs agents tensioactifs.

Par le terme "support", dans le présent exposé, on désigne une matière organique ou minérale, naturelle ou synthétique, avec laquelle le composé est combiné pour faciliter son application sur la plante, sur des graines ou sur le sol. Ce support est donc généralement inerte et il doit être acceptable en agriculture, notamment sur la plante traitée. Le support peut être solide (argiles, silicates naturels ou synthétiques, silice, résines, cires, engrais solides, etc...) ou liquide (eau, alcools, notamment le butanol etc...).

L'agent tensioactif peut être un agent émulsionnant, dispersant ou mouillant de type ionique ou non ionique ou un mélange de tels agents tensioactifs. On peut citer par exemple des sels d'acides polyacryliques, des sels d'acides lignosulfoniques, des sels d'acides phénolsulfoniques ou naphthalènesulfoniques, des polycondensats d'oxyde d'éthylène sur des alcools gras ou sur des acides gras ou sur des amines grasses, des phénols substitués (notamment des alkylphénols ou des arylphénols), des sels d'esters d'acides sulfosucciniques, des dérivés de la taurine (notamment des alkyltaurates), des esters phosphoriques d'alcools ou de phénols polyoxyéthylés, des esters d'acides gras et de polyols, les dérivés à fonction sulfates, sulfonates et phosphates des composés précédents. La présence d'au moins un agent tensioactif est généralement indispensable lorsque le composé et/ou le support inerte ne sont pas solubles dans l'eau et que l'agent vecteur de l'application est l'eau.

Ainsi donc, les compositions à usage agricole selon l'invention peuvent contenir les matières actives selon l'invention dans de très larges limites, allant de 0,05 % à 95 % (en poids). Leur teneur en agent tensio-actif est avantageusement comprise entre 5 % et 40 % en poids.

Ces compositions selon l'invention sont elles-mêmes sous des formes assez diverses, solides ou liquides.

Comme formes de compositions solides, on peut citer les poudres pour poudrage (à teneur en composé pouvant aller jusqu'à 100 %) et les granulés, notamment ceux obtenus

par extrusion, par compactage, par imprégnation d'un support granulé, par granulation à partir d'une poudre (la teneur en composé dans ces granulés étant entre 0,5 et 80 % pour ces derniers cas), les comprimés ou tablettes effervescents.

Le peptide selon l'invention peuvent encore être utilisés sous forme de poudres pour poudrage; on peut aussi utiliser une composition comprenant 50 g de matière active et 950 g de talc; on peut aussi utiliser une composition comprenant 20 g de matière active, 10 g de silice finement divisée et 970 g de talc; on mélange et broie ces constituants et on applique le mélange par poudrage.

Comme formes de compositions liquides ou destinées à constituer des compositions liquides lors de l'application, on peut citer les solutions, en particulier les concentrés solubles dans l'eau, les concentrés émulsionnables, les émulsions, les suspensions concentrées, les aérosols, les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser), les pâtes, les gels.

Les concentrés émulsionnables ou solubles comprennent le plus souvent 10 à 80 % de matière active, les émulsions ou solutions prêtes à l'application contenant, quant à elles, 0,001 à 20 % de matière active.

En plus du solvant, les concentrés émulsionnables peuvent contenir quand c'est nécessaire, 2 à 20 % d'additifs appropriés comme les stabilisants, les agents tensio-actifs, les agents de pénétration, les inhibiteurs de corrosion, les colorants ou les adhésifs précédemment cités.

A partir de ces concentrés, on peut obtenir par dilution avec de l'eau des émulsions de toute concentration désirée, qui conviennent particulièrement à l'application sur les cultures.

A titre d'exemple, voici la composition de quelques concentrés émulsionnables :

Exemple CE 1 :

| | |
|--|----------------|
| - matière active | 400 g/l |
| - dodécylbenzène sulfonate alcalin | 24 g/l |
| - nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules | |
| d'oxyde d'éthylène | 16 g/l |
| - cyclohexanone | 200 g/l |
| - solvant aromatique | q.s.p. 1 litre |

Selon une autre formule de concentré émulsionnable, on utilise :

Exemple CE 2

| | |
|---|-------|
| - matière active | 250 g |
| - huile végétale époxydée | 25 g |
| - mélange de sulfonate d'alcoylaryle et | |
| d'éther de polyglycol et d'alcools gras | 100 g |
| - diméthylformamide | 50 g |
| - xylène | 575 g |

Les suspensions concentrées, également applicables en pulvérisation, sont préparées de manière à obtenir un produit fluide stable ne se déposant pas et elles contiennent habituellement de 10 à 75 % de matière active, de 0,5 à 15 % d'agents tensioactifs, de 0,1 à 10 % d'agents thixotropes, de 0 à 10 % d'additifs appropriés, comme des anti-mousses, des inhibiteurs de corrosion, des stabilisants, des agents de pénétration et des adhésifs et, comme support, de l'eau ou un liquide organique dans lequel la matière active est peu ou pas soluble : certaines matières solides organiques ou des sels minéraux peuvent être dissous dans le support pour aider à empêcher la sédimentation ou comme antigels pour l'eau.

A titre d'exemple, voici une composition de suspension concentrée :

Exemple SC 1 :

| | |
|---|---------|
| - matière active | 500 g |
| - phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé | 50 g |
| - alkylphénol polyéthoxylé | 50 g |
| - polycarboxylate de sodium | 20 g |
| - éthylène glycol | 50 g |
| - huile organopolysiloxanique (antimousse) | 1 g |
| - polysaccharide | 1,5 g |
| - eau | 316,5 g |

Les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser) sont habituellement préparées de manière qu'elles contiennent 20 à 95 % de matière active, et elles contiennent habituellement, en plus du support solide, de 0 à 30 % d'un agent mouillant, de 3 à 20 % d'un agent dispersant, et, quand c'est nécessaire, de 0,1 à 10 % d'un ou plusieurs stabilisants et/ou autres additifs, comme des agents de pénétration, des adhésifs, ou des agents antimottants, colorants, etc...

Pour obtenir les poudres à pulvériser ou poudres mouillables, on mélange intimement les matières actives dans les mélangeurs appropriés avec les substances additionnelles et on broie avec des moulins ou autres broyeurs appropriés. On obtient par là des poudres à pulvériser dont la mouillabilité et la mise en suspension sont avantageuses ; on peut les mettre en suspension avec de l'eau à toute concentration désirée et ces suspensions sont utilisables très avantageusement en particulier pour l'application sur les feuilles des végétaux.

A la place des poudres mouillables, on peut réaliser des pâtes. Les conditions et modalités de réalisation et d'utilisation de ces pâtes sont semblables à celles des poudres mouillables ou poudres à pulvériser.

A titre d'exemple, voici diverses compositions de poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

Exemple PM 1

| | |
|---|-------|
| - matière active | 50% |
| - alcool gras éthoxylé (agent mouillant) | 2,5% |
| - phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant) | 5% |
| - craie (support inerte) | 42,5% |

Exemple PM 2 :

| | |
|---|--------------|
| - matière active | 10% |
| - alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant) | 0,75% |
| - lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant) | 12% |
| - carbonate de calcium (charge inerte) | q.s.p. 100 % |

Exemple PM 3 :

Cette poudre mouillable contient les mêmes ingrédients que dans l'exemple précédent, dans les proportions ci-après :

| | |
|--|-------------|
| - matière active | 75% |
| - agent mouillant | 1,50% |
| - agent dispersant | 8% |
| - carbonate de calcium (charge inerte) | q.s.p. 100% |

Exemple PM 4 :

| | |
|---|-----|
| - matière active | 90% |
| - alcool gras éthoxylé (agent mouillant) | 4% |
| - phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant) | 6% |

5

Exemple PM 5 :

| | |
|--|-------|
| - matière active | 50% |
| - mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant) | 2,5% |
| - lignosulfonate de sodium (agent dispersant) | 5% |
| - argile kaolinique (support inerte) | 42,5% |

10

Les dispersions et émulsions aqueuses, par exemple les compositions obtenues en diluant à l'aide d'eau une poudre mouillable ou un concentré émulsionnable selon l'invention, sont comprises dans le cadre général de la présente invention. Les émulsions peuvent être du type eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau et elles peuvent avoir une consistance épaisse comme celle d'une "mayonnaise".

15

Les composés selon l'invention peuvent être formulés sous la forme de granulés dispersibles dans l'eau également compris dans le cadre de l'invention.

20

Ces granulés dispersibles, de densité apparente généralement comprise entre environ 0,3 et 0,6 ont une dimension de particules généralement comprise entre environ 150 et 2000 et de préférence entre 300 et 1500 microns.

La teneur en matière active de ces granulés est généralement comprise entre environ 1 % et 90 %, et de préférence entre 25 % et 90 %.

25

Le reste du granulé est essentiellement composé d'une charge solide et éventuellement d'adjuvants tensio-actifs conférant au granulé des propriétés de dispersibilité dans l'eau. Ces granulés peuvent être essentiellement de deux types distincts selon que la charge retenue est soluble ou non dans l'eau. Lorsque la charge est hydrosoluble, elle peut être minérale ou, de préférence, organique. On a obtenu d'excellents résultats avec l'urée. Dans le cas d'une charge insoluble, celle-ci est de préférence minérale, comme par exemple le kaolin ou la bentonite. Elle est alors avantageusement accompagnée d'agents tensio-actifs (à raison de 2 à 20 % en poids du granulé) dont plus de la moitié est, par exemple, constituée par au moins un agent dispersant, essentiellement anionique, tel qu'un polynaphtalène sulfonate alcalin ou alcalino terreux ou un lignosulfonate alcalin ou alcalino-terreux, le reste étant constitué par des mouillants non ioniques ou anioniques tel qu'un alcoyl naphtalène sulfonate alcalin ou alcalino-terreux.

30

35

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas indispensable, on peut ajouter d'autres adjuvants tels que des agents anti-mousse.

Le granulé selon l'invention peut être préparé par mélange des ingrédients nécessaires puis granulation selon plusieurs techniques en soi connues (drageoir, lit fluide, atomiseur, extrusion, etc...). On termine généralement par un concassage suivi d'un tamisage à la dimension de particule choisie dans les limites mentionnées ci-dessus. On peut encore utilisé des granulés obtenus comme précédemment puis imprégnés avec une composition contenant la matière active.

De préférence, il est obtenu par extrusion, en opérant comme indiqué dans les exemples ci-après.

Exemple GD1 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché, puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granulés d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

Exemple GD2 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

| | |
|---|-----|
| - matière active | 75% |
| - agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium) | 2% |
| - agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium) | 8% |
| - charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin) | 15% |

Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granulés de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

Ces granulés peuvent être utilisés seuls, en solution ou dispersion dans de l'eau de manière à obtenir la dose cherchée. Ils peuvent aussi être utilisés pour préparer des associations avec d'autres matières actives, notamment antibactériens, ces dernières étant sous la forme de poudres mouillables, ou de granulés ou suspensions aqueuses.

En ce qui concerne les compositions adaptées au stockage et au transport, elles contiennent plus avantageusement de 0,5 à 95 % (en poids) de substance active.

L'invention concerne également un procédé pour le traitement antibactérien thérapeutique pour l'homme ou l'animal par administration d'une dose efficace du peptide

selon l'invention, sous forme libre ou, le cas échéant, sous forme de sels d'addition avec un acide, de sels métalliques ou de sels d'addition avec une base pharmaceutiquement acceptables, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, pilules, poudres (notamment dans des capsules de gélatine ou des cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tel que le stéarate de magnésium ou la talc, un colorant, un enrobage(dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops, et des élixirs pharmaceutiquement acceptable contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants..

Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylène glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de différentes façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans un milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales, qui contiennent, outre le peptide actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylène glycols.

Les compositions stériles pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, pommades, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

En thérapeutique humaine, le peptide selon l'invention est particulièrement utile dans les traitement antibactériens. Les doses dépendent de l'effet recherché et de la durée

du traitement; elles sont généralement comprises entre 50 et 1000 mg par jour par voie orale pour un adulte en une ou plusieurs prises.

5 D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif illustrent les compositions selon l'invention.

Exemple A:

10 On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

| | |
|----------------------------|-------|
| - peptide métalnikowine M1 | 50 mg |
| - amidon | 60 mg |
| - lactose | 50 mg |
| - stéarate de magnésium | 2 mg |

15 Exemple B:

On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| - peptide métalnikowine M 2 | 22,4 mg |
| - eau distillée | q.s.p. 2 cm ³ |

25

30

REVENDICATIONS

5

1. Peptide de formule:

VDKPDYRPRP-X

10

dans laquelle X est un reste peptidique variable comprenant au moins un chaînon "PRP".

2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que X est choisi dans le groupe comprenant:

15

X1= WPRPPSM

X2= GPRPII

X3= GPRPIR

X4= GPRPIIVM

20

3. Composition antibactérienne caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active selon l'une des revendications 1 et 2.

4. Composition selon la revendication 1 utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

25

5. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies bactériennes, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon l'une des revendications 1 et 2.

30

6. Procédé de préparation du peptide selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que, successivement:

a) on fait agir sur des *Podisus maculiventris* au moins un inducteur bactérien de la synthèse biologique de la molécule;

b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymphe ou d'un broyat de *Podisus maculiventris* obtenues précédemment avec un milieu acide à neutre sous agitation, puis par centrifugation;

35

- c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés, sur colonne séparatrice;
- d) on purifie les extraits;
- e) on effectue le séquençage.

5

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu' on utilise comme inducteur bactérien une bactérie (Gram positif).

10

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu' on utilise comme inducteur bactérien une bactérie (Gram négatif).

INSTITUT NATIONAL

de la

PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFA 512544
FR 9504130

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|---|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| A | BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 300, no. 2, 1 Juin 1994 LONDON, GB, pages 567-575, S. COCIANCICH ET AL. 'Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug Pyrrhocoris apterus' * page 574, colonne de gauche, alinéa 2 - alinéa 3; figures 2,4 * | 1,3-8 |
| A | EP-A-0 299 828 (PLANT GENETIC SYSTEMS NV) 18 Janvier 1989 * revendications; exemples * | 1,3-8 |
| A | FR-A-2 695 391 (CENTRE NAT RECH SCIENT) 11 Mars 1994 * revendications; exemples * | 1,3-5 |
| A | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 46, 18 Novembre 1994 BALTIMORE, MD US, pages 18569-28575, K. CASTEEL-JOSSON ET AL. 'Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Post-translational Conversation of the Precursor Structures' * page 28573, colonne de droite, alinéa 1 - page 28575, colonne de gauche, dernier alinéa; figures 1,3 * | 1,3,4,6 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6) |
| | | C07K A61K A01N |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examinateur |
| 24 Novembre 1995 | | Fuhr, C |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant | | |

1

EPO FORM 1501 (01.12.1993)